

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

P3

EP 99 / 06317

21. Okt. 1999

ETU



REC'D 10 NOV 1999	
WIPO	PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Bescheinigung

Die Herren Dr. Fritz Stähler in Weinheim/Deutschland, Cord Friedrich Stähler in Stuttgart/Deutschland, Peer Friedrich Stähler in Frankfurt am Main/Deutschland und Hans Lindner in Stuttgart/Deutschland haben eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren und Meßeinrichtung zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten in einer Probe"

am 28. August 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol G 01 N 21/62 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 14. Oktober 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Weihmayr

Aktenzeichen: 198 39 255.9

A 9161
06 90
11/98

44-00041

PATENTANWÄLTE
European Patent Attorneys
European Trade Mark Attorneys

DIPL.-ING. H. WEICKMANN
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN
DIPL.-CHEM. B. HUBER
DR.-ING. H. LISKA
DIPL.-PHYS. DR. J. PRECHTEL
DIPL.-CHEM. DR. B. BÖHM
DIPL.-CHEM. DR. W. WEISS
DIPL.-PHYS. DR. J. TIESMEYER
DIPL.-PHYS. DR. M. HERZOG

POSTFACH 860.820
81635 MÜNCHEN

KOPERNIKUSSTRASSE 9
81679 MÜNCHEN

TELEFON (089) 4 55 63-0
TELEX 5 22 621

TELEFAX (089) 4 70 50 68

eMail weickmann@compuserve.com

28. Aug. 1998

Unser Zeichen:
18792P DE/Tlct

eingereicht

Anmelder:

Dr. Fritz Stähler, Gässelweg 15, D-69469 Weinheim

Cord Friedrich Stähler, Kelterstr. 35, D-70199 Stuttgart

Peer Friedrich Stähler, Martin-May-Str. 16, D-60594 Frankfurt

Hans Lindner, Vierreichweg 29, D-70569 Stuttgart

Verfahren und Meßeinrichtung zur Bestimmung einer Vielzahl von
Analyten in einer Probe

M 21.10.99
- 1 -

Verfahren und Meßeinrichtung zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten in einer Probe

5

Beschreibung

10

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Meßeinrichtung zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten in einer Probe. Gegenstand der Erfindung sind ferner ein Kit und ein Meßsubstanztträger zur Verwendung bei der Durchführung des Verfahrens.

1 Anwendungsgebiet

15

1.1 Hintergrund

20

25

30

Für die Grundlagenforschung in den Biowissenschaften und für die medizinische Diagnostik sowie einige andere Disziplinen ist die präzise Detektion biologisch relevanter Moleküle in definiertem Untersuchungsmaterial von herausragender Bedeutung. Jeder Organismus ist letztlich aus verschiedenen biologischen Makromolekülen, häufig Polymere wie Nukleinsäuren und Proteine, und davon abgeleiteten Substanzen sowie den Produkten spezieller enzymatischer Syntheseleistungen aufgebaut. Dabei liegt die genetische Information in Form einer enormen Vielfalt von unterschiedlichen Nukleinsäuresequenzen vor, der DNA. Die Realisation dieser Information führt über die Herstellung von Abschriften der DNA in RNA meist zur Synthese von Proteinen, die ihrerseits häufig an biochemischen Reaktionen beteiligt sind. Sekundär werden dadurch zahlreiche organische, teils niedermolekulare, Verbindungen auf- und abgebaut.

11.21.10.99

- 2 -

Somit ergibt sich eine enorme Vielfalt von Substanzen im Körper. Hinzu kommen darüber hinaus noch andere Moleküle, die dem Körper von außen zugeführt werden, wie etwa Pharmaka oder drugs of abuse'.

5

10

15

20

25

Für die Beschreibung des gesunden wie auch des kranken Zustandes eines Organismus ist die Kenntnis über Vorkommen, Menge und Umsatz zumindest der wichtigeren dieser Moleküle außerordentlich nützlich. Mit der Zunahme dieser Kenntnis steigen Verständnis der Zusammenhänge und Nutzen exponentiell an. In der Medizin konnte in stark zunehmendem Masse durch die in vitro-Diagnostik (IVD) ein Instrumentarium zur Bestimmung wichtiger Patientenparameter entwickelt und dem behandelnden Arzt zur Verfügung gestellt werden. Für viele Erkrankungen wäre eine Diagnose zu einem ausreichend frühen Zeitpunkt ohne dieses Instrumentarium nicht möglich (z.B. Infektionskrankheiten wie HIV, HBV o.a.). Das gleiche gilt für eine krankheitsbegleitende Kontrolle spezifischer Parameter (z.B. Blutzuckerspiegel bei Diabetes). In enger Verzahnung von Grundlagenforschung und klinischer Forschung konnten in der Biomedizin die molekularen Ursachen und (pathologischen) Zusammenhänge einiger Krankheitsbilder bis auf die Ebene der genetischen Information aufgeklärt werden. Diese Entwicklung steht allerdings noch am Anfang, und gerade für die Umsetzung in Therapiestrategien bedarf es stark intensivierter Anstrengungen.

30

Biomedizinische Forschung liefert nicht nur Informationen über pathologische Vorgänge im Körper, sondern auch über die dem Leben zugrunde liegenden Mechanismen an sich. Als besonders fruchtbar erweist sich hierbei die Entschlüsselung des Erbgutes und die daraus abgeleiteten Untersuchungen zum Zusammenwirken der jeweiligen Genprodukte. Auch hier stehen

M 21.10.99
- 3 -

wir noch ganz am Anfang, und die weitere Entwicklung hängt maßgeblich vom Fortschritt der technischen Möglichkeiten ab. Aufbauend auf den Erkenntnissen der Genomwissenschaften wird das gezielte Design von neuen Therapien und therapeutisch wirksamen Substanzen angestrebt.

Der zukünftigen Nutzung der aufgezeigten Möglichkeiten für die medizinische Versorgung steht aber die Explosion der, mit entsprechend aufwendigen Verfahren verbundenen, Kosten gegenüber. Hier muß nicht nur auf die Realisation der Möglichkeiten an diagnostischem und therapeutischem Nutzen gedrängt, sondern auch eine Integration in ein tragfähiges, finanzierbares Gesundheitssystem vorangetrieben werden.

1.2 Bedarf

In der klinischen Diagnostik sind IVD-Verfahren ein unverzichtbares Hilfsmittel geworden. Dabei wird zunehmend versucht, die Zahl der bestimmbar Parameter zu erhöhen. Technologien wie z.B.: MicroSpot (Firma Boehringer Mannheim) führen zur Multiplex-Analyse vieler Parameter und zu starker Miniaturisierung. Die technische Umsetzung limitiert die Anzahl der Parameter aber weiterhin auf etwa 10^2 . Die gleichzeitige Detektion von Nukleinsäuren, um z.B. eine genetische Prädisposition zu erkennen, und anderen Faktoren, z.B.: Auto-Antikörper im Rahmen einer Autoimmunerkrankung wie Rheuma, findet bisher nicht statt. Die Nukleinsäurediagnostik, die z.B. Infektionen mit HIV nachweisen kann, setzte bisher auf molekularbiologische Verfahren wie die Polymerase Chain Reaction (PCR) oder Sequenzierung, die entweder nur begrenzte Informationen liefern oder sehr aufwendig und damit teuer sind. Für die Erhebung großer Datenmengen in breiter Anwendung sind sie daher schon aus Kostengründen

teilweise ungeeignet. Ein neuer und viel beachteter Ansatz ist die Nukleinsäureanalyse durch Hybridisierung an immobilisierte Oligonukleotide (Oligos) auf einem festen Untergrund, z.B. einer Silizium-Matrix. Bei solchen sogenannten DNA-Chips wird durch die Bindung komplementärer Stränge an die immobilisierten Oligos ein Signal generiert, wobei eine extrem dichte und miniaturisierte Anordnung der Oligos auf dem Chip, z.B. durch photolithographische Synthese, erreicht und damit die Anzahl der Messpunkte pro Versuch sehr stark erhöht wird (siehe Technologie Firma Affymetrix). Die Erstellung solcher DNA-Chips ist allerdings sehr aufwendig und teuer; außerdem ist die Länge der Oligos beschränkt. Jeder zusätzliche Baustein erfordert umfangreiche Synthese- und Waschschrirte und erhöht damit auch die Menge an genetischem Material, das in einem Messgang für die Analyse benötigt wird. Der Einsatz solcher Bio-Chips ist zur Zeit auf die Nukleinsäureanalytik beschränkt. Die Analyse der physiologischen Zusammenhänge nur auf Basis der Gene, d.h. Nukleinsäuren, ist nicht möglich. Die sogenannte funktionelle Genomik versucht, aufbauend auf der Genanalyse, auch die physiologischen Funktionen und Interaktionen der jeweiligen Genprodukte zu entschlüsseln. Damit wird gerade für die Diagnose und Therapie von Krankheiten sehr wertvolles Wissen geschaffen. Für diese zukünftigen Arbeiten sind neue methodische und apparative Voraussetzungen notwendig. In der biologischen und biomedizinischen Grundlagenforschung herrscht bis heute allgemein ein hohes Maß an manuellen Arbeitsschritten vor, gerade auch in der Analyse von Genprodukten und ihrer Bedeutung im Kontext von Zelle und Organismus. Damit sind zum einen Schwankungen z.B. in der Durchführung von Experimenten und Assays verbunden, aber auch entsprechende Personalkosten pro erzeugter Information und meist ein hoher Zeitaufwand.

11.21.10.99

Heute lassen sich zudem häufig Fragen formulieren, etwa auf Basis der Ergebnisse des Genomprojektes, für deren Beantwortung die gängigen Methoden prinzipiell sogar geeignet wären, aber nicht in einem vernünftigen Zeitrahmen.

5

Insgesamt ergibt sich das folgende Bild:

Um die Versprechungen der modernen Biomedizin für die Patientenversorgung einzulösen, muß eine hochparallele Multiplex-Analyse von 10^2 bis 10^6 Parameter ermöglicht werden, idealerweise die gemeinsame Detektion sehr verschiedener Analyten wie Proteine, Hormone oder Nukleinsäuren, ohne damit unverhältnismäßig hohe Kosten zu verursachen. Eine solche Technologie ist in dieser Patentanmeldung beschrieben.

10

15

1.3 Anwendungsfelder der Erfindung

in vitro Diagnostik und klinische Diagnostik

20

Zusammenführen einer Vielzahl von Parametern zur akuten Diagnose und zur Routineuntersuchung (präventive Medizin); daraus wird sich wertvolles, statistisch auszuwertendes Wissen zur (extrem) frühen Diagnostik verschiedenster Krankheitsbilder ableiten; die erzeugte Datenmenge ist erst durch die Entwicklungen in der Informationstechnologie auswertbar geworden.

25

DNA und RNA Diagnostik

30

- Infektionskrankheiten (HIV, HBV etc.),
- Tumorfrüherkennung,
- Tumorklassifizierung (Typ und Status),

M 21.10.99

- 6 -

- Genkrankheiten,
- Onkologie

Biologische Grundlagenforschung, insbesondere Genomik und Proteomik

Erfassung von sehr vielen Messpunkten im untersuchten System, z.B. alle exprimierten Gene oder alle in ein Kulturmedium abgegebenen Proteine und Wachstumsfaktoren; daraus wird sich ein enormer Erkenntnisgewinn in der biologischen Grundlagenforschung (Entwicklungsbiologie, Stammzellkultur, Tissue engineering, Transplantationsmedizin, Regeneration) ableiten, der auch zu wichtigen Durchbrüchen in der Biomedizin und zu entsprechenden Anwendungen führen wird.

Forensik

Wie für die Verwendung von DNA GenChips der Firma Affymetrix gezeigt wurde (Science 280:1077-1082) kann durch entsprechende biochemische Rahmenbedingungen in der Hybridisierung zwischen Punktmutationen in der Basenabfolge unterschieden werden; aus den hier vorgestellten SMART Beads läßt sich daher eine Datenbank mit genetischen Proben erstellen (z.B. erfasster Sexualstraftäter) und zum Screening von Zehntausenden von DNA Proben gegen eine gesuchte Sequenz innerhalb von wenigen Stunden nutzen.

Lebensmittelanalytik

Durch diese Erfindung sollte das rasche, kosteneffektive Analysieren von Lebensmitteln z.B. auf das Vorhandensein bestimmter Gene oder Proteine hin möglich werden.

Screening von medizinischen Produkten

Die Herstellung z.B. von Blutpräparaten ist immer noch mit einem hohen Aufwand für die Sicherheitsvorkehrungen zur Reinheit verbunden. Ein zeit- und kosteneffektives Screening solcher Proben wird mit dieser Erfindung möglich werden.

2 Stand der Technik

Bei BioChips handelt es sich um miniaturisierte hybride Funktionselemente mit biologischen und technischen Komponenten, z.B. an der Oberfläche immobilisierte Biomaterialien, die als spezifische Interaktionspartner dienen können (z.B. Antikörper, DNA-Oligonukleotide) und eine Silizium-Matrix. Meist sind diese Funktionselemente in Reihen und Spalten angeordnet, man spricht dann von BioChip arrays. Da tausende von biochemischen Funktionselementen auf dem BioChip angeordnet sein können, müssen diese mit mikrotechnischen Methoden hergestellt werden.

Vor allem in den USA wird die Entwicklung von miniaturisierten BioChips mit enormen Mitteln vorangetrieben. Die wichtigsten in diesem Umfeld tätigen Firmen sind im folgenden aufgelistet:

Affymetrix, Beckman Instruments, Blue Chip Biosystems, Caliper Technologies, Cura-Gen, Genometrix, Gene Trace Systems, Hyseq, Incyte Pharmaceuticals, Molecular Tool, Nanogen, Pharmacia, Synteni, Third Wave Technologies, Vysis.

Bisher bekannte BioChips lassen sich nach folgenden Kriterien klassifizieren:

M 21.10.99
- 8 -

Nachweisprinzip:

- Chromatographische Verfahren
- Interaktion von Analyten mit fester Phase, meist
5 immobilisierter Interaktionspartner (z.B. Hybridisierung von
Nukleinsäuren an DNA-Oligonukleotide).
- Detektionsverfahren (optisch, elektrisch).

- Markerbasiert (z.B. Absorption, Fluoreszenz oder Lumineszenz)
10 oder markerfreie Nachweisverfahren (Lichterzeugung zum
Reaktionsnachweis).

- Zuordnung des Analyten zu seinem Träger [Festphase]
(ARRAY mit mehr als einem immobilisierten Interaktionspartner pro
15 Träger oder SINGLE mit nur einem immobilisierten
Interaktionspartner pro Träger).

- Herstellungsverfahren (z.B. Oligonukleotide direkt auf dem BioChip
lichtaktiviert synthetisieren, fertig synthetisierte Oligonukleotide
20 spotten, Beads oder Tubes beschichten).

- Trägerarten (Glas-Chips, Kunststoff-Chips, Mikrotiterplatten, Tubes
oder Beads).

- 25 - Präsentation zur Detektion (seriell, parallel).

- Optische Detektion (seriell im Scanner oder parrallel mit einer
CCD-Kamera).

- 30 Von den Konkurrenten seien drei hervorgehoben, die wesentliche
Innovationen auf diesem Gebiet entwickelt haben.

M 21.10.99

GenChip von
Affymetrix Inc., Santa Clara, Kalifornien:

5 * Neuartige in situ Synthese von DNA-Oligonukleotiden auf
planaren Chips in hoher Dichte (Juli 98: bis 64.000
unterschiedliche Oligos auf 1 cm²).

10 * Herstellungsverfahren basiert auf der in der Halbleiter-Industrie
verwendeten und optimierten Photolithographie, wobei eine
lichtaktivierbare Bindung von Oligos an die Chipoberfläche, sowie
an bereits vorhandene Oligos, verwendet wird.

15 * Herstellungsdauer beträgt aufgrund einer Vielzahl von
Verfahrensschritten mehrere Stunden.

* Serielle optische Detektion des planaren Chips in einem
Fluorescensscanner.

20 * Hybridisierungsdauer der Probe auf einem Chip ca. 1.5 Stunden.

25 * Erste Produkte (Sequenzierchip für Tumormarker p53 Exons
2-11, Brustkrebsgen BRCA1 Exon 11, HIV GeneChip).

Flowmetrix von
Luminex Corp., Austin, Texas

30 * Fluoreszenzkodierte Mikrosphären (ca. 5,5 µm (l) als "Festphase"
(z.Zt. 64 Farben, bestehend aus 8 Orangetönen und 8 Rottönen).

* Serielle "online" Detektion der bewegten, eindimensional (1D)
aus einer Kapillare austretenden, Mikrosphären in modifizierten

FACS Geräten (Fluorescence activated cell sorting), sogenannten Flow Cytometern.

* Anregung erfolgt über monochromatisches Laserlicht, wobei für jede Fluoreszenzfarbe ein Anregungslaser benötigt wird. Die Fluoreszenzfarben können entweder für die Mikrossphärenidentifikation (derzeit zwei Laser: Orange und Rot) oder für den Reaktionsnachweis (derzeit 1 Laser: Grün) verwendet werden.

* Erste Assays für Wachstumsfaktoren bei Erprobern im Test.

Optical Sensor Arrays von
Max Tishler Lab. for Org. Chem., Tufts Univ., Medford,
Massachusetts

* Verwendung von farbigen Beads (Mikropartikel) als "Festphase" (derzeit 3 verschiedene Fluoreszenzfarben).

* Festlegen der Beads in einem Mikroarray aus hexagonalen Mikrowells (Vertiefungen).

* Der Mikroarray (Gitter) wird durch das Wegätzen der Seelen (Mitten) eines Endes von Glasfaser-Lichtleitern erzeugt.

Eintauchen des mit den Beads präparierten Mikroarray-Endes der Glasfaser in die Probe.

* Optische Auslesung im Rücklichtfluoreszenzverfahren durch die Glasfasern, eine optisch vergrößernde Fluoreszenzmikroskopoptik (derzeit 10-20 fache Vergrößerung) und einen Strahlteiler (Rücklichtprinzip) mittels eines CCD Chips.

3 Gegenstand der Erfindung und damit gelöste Aufgabe

Gegenstand der Erfindung gemäß Anspruch 1 ist ein Verfahren zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten in einer Probe umfassend die Schritte:

- (a) Inkontaktbringen der Probe mit
 - (i) einer Vielzahl von Spezies von Mikropartikeln, wobei jede Spezies zum Nachweis von bestimmten Analyten geeignet ist und eine bestimmte, von anderen Spezies optisch unterscheidbare Codierung aufweist, und
 - (ii) einer Vielzahl von löslichen analytspezifischen Nachweisreagenzien, die eine signalgebende Gruppe tragen oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig sind,
- (b) anschließendes Aufbringen der Mikropartikel auf einen Träger und mindestens
- (c) Bestimmen der Analyten durch optisches Erfassen der Codierung und der Menge, des Vorhandenseins oder/und der Abwesenheit der signalgebenden Gruppen auf mindestens einer Spezies von individuellen Mikropartikeln auf dem Träger.

Bevorzugte Weiterbildungen des Verfahrens sind in den Ansprüchen 1 - 27 angegeben.

Das Verfahren nach der Erfindung ist insbesondere verwendbar für die Diagnostik klinischer Parameter, z.B. für die Nukleinsäure-Diagnostik, für die biologische Grundlagenforschung, für die Forensik, für die Lebensmittelanalytik und für das Screening von medizinischen Produkten.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Kit gemäß Anspruch 29, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 - 27. Das Kit umfaßt

- (a) eine Vielzahl von Spezies von Mikropartikeln in freier Form, wobei jede Spezies zum Nachweis von bestimmten Analyten geeignet ist und eine bestimmte, von anderen Spezies optisch unterscheidbare Codierung aufweist,
- (b) eine Vielzahl von löslichen analytspezifischen Nachweisreagenzien und
- (c) einen Träger.

Gegenstand ist ferner eine Meßeinrichtung zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten in einer Probe insbesondere nach dem Verfahren gemäß der Erfindung. Die Meßeinrichtung umfaßt einen elektronischen Bilderfassungssensor zur unvergrößert-bildweisen Detektion des optischen Verhaltens eines Ensembles von mit der Probe in Kontakt gebrachten, auf einen Träger aufgebrachten Mikropartikeln, Mittel zur Anregung der Signalabgabe signalgebender Gruppen an Mikropartikeln in dem Ensemble von Mikropartikeln auf dem Träger, eine Bilddaten des elektronischen Bilderfassungssensors auswertende Datenverarbeitungseinrichtung zur Bereitstellung von Informationen über das Vorhandensein bestimmter Analyten in der Probe auf der Basis des detektierten optischen Verhaltens des Ensembles von Mikropartikeln.

Bei dem elektronischen Bilderfassungssensor handelt es sich vorzugsweise um einen farbtüchtigen CCD-Bildaufnehmer. Der Bildaufnehmer kann unmittelbar mit dem Träger in Verbindung gebracht werden, so daß umständliche optische Bildübertragungslinsen, Lichtleiter und optische Vergrößerungselemente entfallen können.

Bevorzugte Weiterbildungen der in Anspruch 30 angegebenen Meßeinrichtung nach der Erfindung sind in den Ansprüchen 31 - 38 angegeben.

5

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Träger für die Durchführung des Verfahrens nach der Erfindung, wobei der Träger einen Hohlraum, insbesondere flächig ausgedehnten Kapillarspalt zur Aufnahme des Ensembles von Mikropartikeln zwischen zwei mit ihren Flachseiten einander gegenüberliegenden Platten aufweist, von denen wenigstens eine transparent ist.

10



Der Abstand zwischen den beiden Platten ist so gewählt, daß in den Hohlraum jeweils nur eine Schicht von nebeneinander liegenden Mikropartikeln paßt.

15

Gegebenenfalls kann der Abstand zwischen den Platten wahlweise einstellbar sein.

20



Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Träger zur Durchführung des Verfahrens nach der Erfindung, wobei der Träger eine Vielzahl insbesondere parallel zueinander verlaufender Kapillarkanäle aufweist und zumindest im Bereich der Kapillarkanäle optisch transparent ist. Der letztgenannte Träger ermöglicht auf einfache Weise die bewegliche Präsentation der Mikropartikel während der optischen Detektion.

25

30

Mit dem hier als "Fraktal SMART Chip - FSC" bezeichneten Träger können Tausende unterschiedlicher Assays (Messungen) in einem Meßvorgang durchgeführt werden. Das Prinzip des fraktalen BioChips beruht auf einer doppelten Kodierung der als Immobilisierungspartner dienenden Festphase aus Mikropartikeln (Beads). An diese kodierten Beads (z.B. farbcodierte Glasbeads)

11.21.10.99
- 14 -

werden Fängermoleküle (z.B. Oligonukleotide) immobilisiert, wodurch die "intelligenten, individuellen" SMART Beads entstehen. Durch die Kodierung der SMART Beads sind die Fängermoleküle auf der Oberfläche der SMART Beads jederzeit lokalisierbar und identifizierbar. Zum anderen kann z.B. auch der in der Probe gesuchte Zielanalyt (z.B. DNA-Analyt) kodiert werden (z.B. mit Fluoreszenzlabel). Im Analysesystem lagern sich dann unter Hybridisierungsbedingungen die jeweils passenden Zielanalytmoleküle an die Fängermoleküle auf der SMART Beadoberfläche an. Diese Anlagerung geschieht in einem dreidimensionalen Gefäß unter entsprechend günstigen strömungstechnischen Mischungsbedingungen.

Zur Detektion und Auswertung der jeweiligen Molekülanlagerungen werden die SMART Beads in eine planare Anordnung gebracht. Die SMART Beads müssen dabei nicht in ein festes Gitter oder geometrisches Raster eingebracht werden. Auf Grund der planaren Ausrichtung der SMART Beads und der optischen, doppelten Kodierung kann die Detektion aller SMART Beads parallel mit Hilfe von CCD-Techniken erfolgen und zwar sowohl im ruhenden wie auch im bewegten Zustand der SMART Beads.

Bei der Detektion kann auf optisch abbildende Linsensysteme verzichtet werden, wenn parallel gerichtetes Licht eingesetzt wird und die Größe der SMARTS so gewählt wird, daß sie eine ausreichende Anzahl Pixelelemente des Farb-CCD-Chips überdecken. Durch diese direkte Nutzung (keine Optik) hochparalleler CCD-Matrix Chips mit einer großen Anzahl (derzeit 8 Mio. Farbpixel pro 1 cm²) an Pixeln (optischen Meßpunkten bzw. Sensoren) ist es möglich eine Vielzahl von SMART Beads anhand ihrer spezifischen Farbkodierung (spektrale Identität) zu detektieren. Aufwendige Bewegungseinrichtungen für den Träger

(Chip) oder die Detektionseinheit, wie sie in Scannern notwendig sind, entfallen völlig. Die vorgegebenen Abmessungen der CCD-Chips (mehrere cm²) ermöglichen die Verwendung einer sehr großen Zahl an SMART Beads (mehrere 100.000) mit einer moderaten Partikelgröße (mehrere 10 µm), welche auch eine spektrale Identifikation nach dem Absorptionsprinzip zuläßt. Dadurch können wesentlich mehr Identitäten (Farben) fehlerfrei identifiziert werden, als dies bei einer Fluoreszenzfarbgebung (trotzdem auch anwendbar) möglich wäre. Derzeit können CCD-Chips ca. 16. Mio. Farben erkennen. Die maximale Anzahl unterschiedlicher spektraler Identitäten, welche noch fehlerfrei detektiert werden können, ist durch die notwendige spektrale Abstufung für die optische Messung sowie die Möglichkeit der reproduzierbaren Farbgebung der SMART Beads im Produktionsprozess gegeben.

Die Identifikation umfaßt sowohl die Bestimmung der SMART Bead Klasse (Farbe), als auch der exakten Lage. Dies wird durch die Vielzahl an CCD-Pixeln, welche pro SMART Bead zur Detektion zur Verfügung stehen, ermöglicht. Diese Vielzahl an Meßwerten bildet die Basis welche ein umfangreiches, mathematisches Multiplexen, bei der Identifikation des einzelnen SMART Beads, im zweidimensionalen Array erlaubt. Das Bearbeiten der anfallenden Datenmengen ist, durch die Entwicklung der Leistungsfähigkeit bei gleichzeitigem Preisverfall von modernen Rechnersystemen, problemlos möglich.

Die Detektion der Nachweisreaktion kann sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen machen:

- Welche Fängermoleküle (Auswertung über Beadfarbe oder ggf. charakteristische Formkontur) haben Anlagerungspartner gefunden

11.21.10.99

- 16 -

(Auswertung der fluoreszenzmarkierten Labels an den lokalisierten Beads).

* Wieviele Fängermoleküle einer Klasse haben einen Hybridisierungspartner gefunden.

Die - relativ zu anderen Bead-Verfahren - großen SMART Beads erlauben sowohl bei der Produktion (Erzeugung und biochemische Beschichtung) als auch im Analysesystem einschließlich Detektionseinheit eine einfache fluidische Handhabung, welche bis auf die Handhabung eines einzelnen Mikropartikels optimiert werden kann. Das Gleiche gilt auch für die Detektion. Auch hier ist besonders für Anwendungen in der DNA-Analytik eine Identifikation des einzelnen SMART Beads möglich.

Die Erfindung deckt somit folgende Anforderungen in der klinischen Diagnostik:

* Vielzahl der simultan bestimmbarer Parameter (erreicht durch miniaturisierte SMART Beads und hochauflösende optische Detektion).

* Schnelle Auswertung (erreicht durch die parallele optische Auswertung in planarer Ausbringung, welche auch noch durch eine Detektion von bewegten SMART Beads beschleunigt werden kann).

* Kostengünstig (erreicht durch den Verzicht auf teure, mikrosystemtechnische und optische Komponenten sowie aufwendige Synthetisierungsschritte bei der BioChip-Herstellung).

M 21.10.99
- 17 -

Der Wert der Erfindung liegt sehr stark in der geeigneten Kombination von Technologien.

4 Grundzüge des Lösungsweges

5

Der prinzipielle Lösungsweg in diesem System geht von der Kodierung (spezifische Identität der einzelnen Mikropartikel) über die biochemische Beschichtung der Oberfläche für das Nachweisverfahren (Labeling oder coating) der SMART Beads über die Vermischung der SMART Beads mit der zu untersuchenden Probe im Analysesystem bis zur Präsentation und Detektion.

10

4.1 Fraktale feste Phase (SMART Beads) und spezifische Kodierung

15

Um die einzelnen SMART Beads (Mikropartikel definierter Größe und Geometrie) später eindeutig detektieren zu können, werden die Beads individuell kodiert. Das bedeutet jede SMART Bead-Klasse erhält ihre eigene Identität, wodurch aus den einheitlichen Trägerkörpern identifizierbare Individuen werden, was eine Wiedererkennung der einzelnen SMART Bead-Klassen (eine Klasse sind hier mehr als ein SMART Bead mit der gleichen Identität) in der Detektionseinheit ermöglicht. Die Mikropartikel (Beads oder Mikrospheren) werden erst durch ihre individuelle Kodierung zu eigentlichen SMART Beads.

20

25

Als Kodierung allgemein sind zum Beispiel die Partikelgröße, -geometrie, -gewicht und physikalische Eigenschaften wie zum Beispiel Magnetisierbarkeit o.ä. anwendbar. Diese Prinzipien weisen jedoch nur eine sehr beschränkte Anzahl an "Abstufungen" auf, so daß nur wenige verschiedene Kodierungen erzeugt werden können.

30

Farb- oder Elektromagnetische- Kodierungen weisen dagegen eine Vielzahl an Abstufungen auf, was die Identifikation von sehr vielen SMART Beads ermöglicht. Die Idee der vorliegenden Erfindung beruht auf der Nutzung einer Farbkodierung, also einer spektralen Identität der SMART Beads in Kombination mit der ständig wachsenden Leistungsfähigkeit von CCD-Matrix Chips zur optischen Detektion. Diese Chips können derzeit 16.777.216 Farben identifizieren.

Als Verfahren zur Farbkodierung der SMART Beads sind u.a. denkbar:

- * Lichtdurchlässige Einfärbung des Materials,
- * Lichtdurchlässige Färbung der Oberfläche,
- * Lichtundurchlässige Einfärbung des Materials,
- * Lichtundurchlässige Färbung der Oberfläche,
- * Einbettung von Fluoreszenzfarbstoffen,
- * Lumineszenzverfahren.

4.2 Analytbestimmung - Grundprinzip

Als allgemeines Prinzip zur Analytbestimmung soll die Bindung des Analyten an seinen spezifischen immobilisierten Interaktionspartner auf der Oberfläche eines definierten SMART Beads genutzt werden.

Dabei soll die Spezifität dieser Interaktion die selektive Bindung des Analyten nur an den dafür entsprechend bestückten, d.h. den immobilisierten Interaktionspartner tragenden, SMART Beads ermöglichen, und damit die molekulare Erkennung und anschließende Detektion des Analyten in einem heterogenen Gemisch. Alle durch ihre gleichen spektralen Eigenschaften (Farbe) als Klasse definierten SMART Beads erhalten jeweils die gleiche Bestückung mit kovalent gebundenem immobilisierten Interaktionspartner. Somit führt die Anwesenheit des Analyten im Untersuchungsmaterial zu Bindung und damit Signalerzeugung nur auf dieser spektral identifizierbaren Klasse an SMART Beads. Dieses Signal dient bei Kenntnis der jeweiligen, klassen-spezifischen Bestückung zur Identifikation des gebundenen Analyten und damit zu seiner Detektion im Untersuchungsmaterial.

Das Detektionsprinzip entspricht damit etablierten Verfahren z.B. bei der Entwicklung von ELISA Tests (enzyme linked immunosorbent assay). Die Beschichtung von Beads mit einem immobilisierten Interaktionspartner ist "Stand der Kunst" (z.B. Avidin-Beschichtung von magnetischen Beads, Dynal; Antikörper-Beschichtung im ELISA- Format, Flowmetrix von Luminex).

4.3 Vermischung der SMART Beads mit der Probe im Analysesystem

Die spezifisch farb- und analytkodierten SMART Beads werden im Analysesystem mit der zu untersuchenden Probe vermischt. Diese Vorgänge sind identisch mit denen anderer Bead-basierter Verfahren mit einer "ortsungebundenen" Festphase (zum Beispiel Flowmetrix von Luminex). Das bedeutet ein, für eine spezielle Anwendung zusammengestellter, Satz von SMART Beads, zum Beispiel aus 10.000 Mikropartikeln zu je 100 SMART Beads einer

11.21.10.99
- 20 -

von 100 Klassen, wird mit der entsprechend vorbereiteten Probe in einem Gefäß zusammengebracht, temperiert und so lange gemischt, bis mit ausreichender Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden kann, das jeder SMART Bead die Möglichkeit hatte, seinen Reaktanten zu finden.

4.4 Präsentation der SMART Beads zur Detektion

Bei allen Verfahren und Techniken zur Präsentation der SMART Beads für die Detektion ist das Ziel, eine möglichst schnelle und gleichzeitig sichere und somit effiziente Detektion zu erreichen, da nur die exakt vermessenen Ereignisse zum Meßergebnis beitragen.

Die eine Möglichkeit um einen hohen Durchsatz bei der Detektion zu erreichen, ist eine möglichst schnelle Präsentation der SMART Beads am Detektor - zum Beispiel analog zum Flow Cytometer Prinzip, wo die Partikel mit hoher Geschwindigkeit durch eine Kapillare gepreßt und am Austritt "online" im "Partikelstrahl" vermessen werden. Die andere Möglichkeit ist eine Parallelisierung der Detektion z.B. durch eine zweidimensionale Präsentation der SMART Beads am Detektor (SMART Bead Array).

Natürlich muß der verwendete Detektor in der Lage sein die Signale ausreichend schnell und parallel zu erfassen. Hierzu sollen CCD-Chips direkt, das heißt ohne Verwendung einer Optik eingesetzt werden. Dadurch sind die Abmessungen für die Fläche, auf welcher die SMART Beads zur Detektion bereitgestellt werden sollen, vorgegeben. So haben derzeit hochauflösende Standardchips (keine Sonderanfertigungen) Außenmasse von ca. 25 x 37 mm. Will man auf dieser Fläche zum Beispiel ca. 200.000 SMART Beads anordnen, so könnte jeder SMART Bead einen Durchmesser von 60 µm haben und jeder SMART Bead würde

11.11.99
- 21 -

5 trotzdem noch etwa 40 Farbpixel überdecken, was eine zuverlässige Detektion erst ermöglicht. Bei dichtester Packung durch reihenweises Versetzen, wären sogar noch mehr SMART Beads unterzubringen bzw. die SMART Beads könnten noch größer sein. Natürlich ist eine Miniaturisierung und damit weitere Parallelisierung denkbar. Als Verfahren zur planaren Ausbringung der SMART Beads sind folgende Techniken möglich:

- 10
- * Zweidimensionaler kapillarer Spalt,
 - * Parallele Kapillaren oder Röhren,
 - * Ausstreichen, Stempeln (analog Blutausstrich) oder Rollen,
 - 15 * Aufspotten etc.

4.5 Anregungslichtquelle

20 Um die die SMART Beads in ihrer planaren Ausbringung erkennen zu können, ist eine Anregungslichtquelle notwendig, welche den Anforderungen des verwendeten Farbcodierungsverfahrens ebenso genügt, wie dem gewählten Nachweisverfahren für eine erfolgte Reaktion auf der Oberfläche der SMART Beads. Ggf. sind für die beiden Schritte auch zwei getrennte Lichtquellen vorzusehen, so zum Beispiel, wenn die Identität der SMART Beads durch eine Absorptionsmessung und der Reaktionsnachweis durch ein Fluoreszenzsignal detektiert werden soll. Mögliche Lichtarten sind:

- 25
- * Paralleles, flächiges Licht (kontinuierlich oder als Blitz),
 - 30 * Lokale, örtliche Anregung zum Beispiel durch Lichtstriche oder Lichtpunkte.

11.21.10.99
- 22 -

Diese Lichtarten müssen je nach Anforderungen monochromatisch (z.B. Laserlicht für Fluoreszenzanregung) oder heterogen (z.B. Weißlicht für Absorptionsmessung) sein.

5 4.6 Identifikation der SMART Beads

Die optische Erkennung der spektralen Identität des einzelnen SMART Beads im SMART Bead Array liefert zwei Informationen:

10 * Welcher SMART Bead Klasse (SMART Beads mit gleicher Farbe) gehört ein SMART Bead an, woraus der auf seiner Oberfläche gebundene Analyte ermittelt werden kann:

15 --> Identität des einzelnen SMART Beads: "Wer bin ich und um welchen auf meiner Oberfläche gebundenen Analyten handelt es sich folglich".

20 * Wo genau im planaren SMART Bead ARRAY befindet sich der jeweilige SMART Bead.

--> Lage des einzelnen SMART Beads: "Wo bin ich".

25 Genutzt werden hierzu moderne, hochauflösende CCD-Kamera Chips. Diese ermöglichen sowohl eine sehr schnelle, als auch eine hoch parallele Detektion der Lichtsignale.

30 Die zweite Information der Lageerkennung ist bei den Präsentationsverfahren ohne genau vorgegebene Lage (kapillarer Spalt, Ausstrich etc.) notwendig, um das anschließende Signal des Nachweisverfahrens exakt einem SMART Bead zuordnen zu können. Bei den Verfahren mit einer vorgegebenen Lage (Spotten

etc.) kann die Information für die Qualitätssicherung verwendet werden.

4.7 CCD-Detektion der spezifischen Nachweisreaktion (Analyt-Bindung)

Wie in 6.2.3 im einzelnen beschrieben soll die Bindung eines Analyten direkt oder indirekt zu einem Lichtsignal führen. Dies kann durch ein Anregungslicht (Fluoreszenz) oder durch Photonenemission (Lumineszenz) erfolgen.

Das Lichtsignal wird auf dem CCD Chip detektiert, und zwar sowohl nach Wellenlänge (Farbe) als auch nach Intensität differenziert. Das aufgenommene Spektrum kann qualitativ oder quantitativ ausgewertet werden. Zudem läßt die Unterscheidung von Wellenlängen und Intensitäten auch eine Unterscheidung von Signalquellen zu.

5 Entwickelte Verbesserungen und damit geschaffene Vorteile gegenüber vorhandenen Systemen

Der fraktale Chip (FSC) verschiebt die Information über die Ausstattung eines Messpunktes (z.B. eines DNA Oligos bestimmter Sequenz) von der lokalisierten Synthese oder Beschichtung (z.B. Photolithographie, Aufspotten) zur Kodierung der fraktalen Komponenten. Damit entsteht eine extrem flexible Anordnung mit einem enormen Potential für die Multiplexanalyse.

Darüber hinaus gelingt in diesem Format durch Trennung von Synthese der eigentlichen Sensoren (d.h. der SMART Beads) und der Inkubation mit dem Untersuchungsmaterial die Verbindung sehr unterschiedlicher Bereiche biochemischer Diagnostik. Konkret

soll die gleichzeitige Analyse von DNA, Proteinen und anderen interessierenden Parametern ermöglicht werden.

Durch immer neue Kombinationen bewährter SMART Klassen für einen Untersuchungsansatz können die im Batch-Verfahren hergestellten SMART Beads für eine Vielzahl von diagnostischen und analytischen Fragestellungen bereitgestellt werden. Daraus ergeben sich gerade für die Produktion große Vorteile, was sich in den Kosten niederschlägt.

In diesem Ansatz wird u.a. durch moderate Größe der SMART Beads, durch die direkte Detektion und durch Nutzung der hochentwickelten CCD Technologie die Realisation von 103 bis 106 unterscheidbaren SMART Bead Klassen in einem Messgang angestrebt, was sowohl in der technischen Lösung "Flowmetrix" von Luminex (Zellsorter und serielle Analyse) als auch in dem Ansatz eines "Optical Sensor Arrays" des Max Tischler Lab. nicht impliziert werden kann. Damit wäre das erste Multiplexverfahren etabliert, das an Dichte der Messpunkte mit den gerade entwickelten DNA-Arrays konkurrieren kann, ohne jedoch deren Beschränkung auf die DNA-Analyse und ohne die aufwendige und teure Gesamtchip- Synthese. Die Flexibilität und anwenderorientierte Ausbaubarkeit der einzelnen Komponenten stellen wesentliche Vorteile der Erfindung dar.

5.1 Farbcodierte SMART Beads für Absorptionsmessungen

Ein Vorteil der parallelen und direkten Detektion der SMART Beads auf einer Fläche, welche der Größe eines CCD-Chips von derzeit ca. 25 x 37 mm entspricht, liegt aus Sicht der Farbgebung, in der moderaten Partikelgröße. So sind SMART Beads mit ca. 60 μm Durchmesser eine Zehnerpotenz größer als bei "Flowmetrix" von

Luminex oder dem "Optical Sensor Array" der Tufts Universität und damit wesentlich leichter zu produzieren, farbkodieren, biochemisch zu labeln, fluidisch zu handhaben und sie liefern ein wesentlich stärkeres Lichtsignal sowohl bei der SMART Bead Identifikation, als auch beim anschließenden Reaktionsnachweis.

Damit wird eine Absorptionsmessung als optisches Meßverfahren zur SMART Beads Identifikation überhaupt erst möglich, wobei die Absorptionsmessung die folgenden Charakteristika aufweist:

- * Es ist eine sehr große Vielfalt an eindeutig meßbaren Farbvarianten (Abstufungen) erzeugbar, was z.B. bei Fluoreszenzverfahren deutlich limitierter ist,
- * Eine niedrigere optische Auflösbarkeit, sprich die Partikel müssen größer sein, als dies beispielsweise bei einer Fluoreszenzmessung notwendig ist.

Diesen Charakteristika kommt die durch die Größe der CCD-Chips bedingte relative Größe der SMART Beads entgegen. So kann mit den SMART Beads eine sehr große Zahl an unterschiedlich farbkodierten Mikro-Trägern erzeugt werden, was besonders für eine Anwendung des Systems FSC in der DNA-Analytik interessant ist. Bekannte Systeme, wie "Flowmetrix" oder der "Optical Sensor Array" sind hier durch die Partikelgröße und das damit verbundene Fluoreszenzverfahren stark eingeschränkt, was die beiden Verfahren für die DNA-Sequenzierung stark einschränkt. Außerdem sind beide Systeme, bedingt durch ihr Verfahren, auf sehr kleine Partikel beschränkt. "Flowmetrix" vom Meßprinzip des Flow Cytometer her und der "Optical Sensor Array" durch die Durchmesser der Glasfasern, welche sich nicht beliebig vergrößern lassen.

Das erreichbare Optimum an unterschiedlich farbigen SMART Beads beim FSC wird durch die folgenden Parameter bestimmt:

* Anzahl chemisch möglicher Farbgebungen zur eindeutigen Identifikation eines SMART Beads

* Minimal zulässige Größe für die fehlerfreie Identifikation (ausreichend starkes Lichtsignal) der SMART Beads,

* Ausreichende Anzahl an CCD-Pixel pro SMART Bead zur fehlerfreien Identifikation.

Das Potential des Systems und ggf. die weitere Miniaturisierung der SMART Beads wird mit der weiteren Miniaturisierung, bei gleichzeitiger Steigerung der Empfindlichkeit, der CCD Sensoren automatisch vorangetrieben.

Die absolute Probenmenge liegt mit 3 ml für die Benetzung von ca. 200.000 Stück der 60 μm SMART Beads in einem sehr vernünftigen Volumenbereich. Insbesondere ist es möglich, alle SMART Beads in die Messung einzubeziehen, also eine 100 % Messung aller SMART Beads durchzuführen.

Bevorzugte Möglichkeiten der Farbgebung für die Absorptionsmessung sind:

- * Eine lichtdurchlässige Färbung des Materials der SMART Beads.
- * Eine lichtdurchlässige Färbung der Oberfläche der SMART Beads.

Biochemische Verfahrensvorteile bei der Beschichtung der SMARTS liegen in den nachfolgend aufgeführten Aspekten:

11.21.10.99
- 27 -

* Getrennte Synthese ermöglicht sehr unterschiedliche, immobilisierte Interaktionspartner an die Beads zu koppeln.

* Erstmals können DNA, PNA, Proteine etc. in einem Format vereinigt werden.

* Für die DNA Analytik, speziell die Bestimmung exprimierter Gene, ist die potentielle Ankopplung ganzer cDNAs oder EST's (expressed sequence tag) ein großer Vorteil gegenüber "klassischen" DNA Chips, da für die eindeutige Identifikation einer RNA oder DNA viel weniger Messpunkte ausreichen, als dies mit Arrays kurzer Oligonukleotide der Fall ist (idealerweise nur ein Messpunkt).

5.2 Analytspezifisches Labeling (Beschichten) der farbigen SMART Beads

Vorteile bei der biochemischen Beschichtung der SMART Beads aus Sicht der Produktionstechnik liegen in den nachfolgend aufgeführten Aspekten:

* Multiplexing von Einsatzstoffen und Trägerpartikeln (SMART Beads).

* Parallelisierbare Produktion im Hochdurchsatz Batchverfahren.

* Alle Handhabungs- und Produktionsschritte können fluidisch durchgeführt werden.

* Physikalisch vorteilhafte Strömungsvorgänge.

* Einfach und damit sicher automatisierbare Strömungsvorgänge
(Reduzierter Arbeitsaufwand und damit billiger in der Produktion).

Beim biochemischen Beschichten der SMART Beads in der
Produktion können die Abläufe durch das flexible Multiplexing von
Einsatzstoffen, wie der Analyten (z.B. G, A, C, T oder längere
Oligo-Sequenzen) oder der Waschflüssigkeiten sowie der SMART
Bead Klassen (Mikropartikel einer Farbe) einfach optimiert werden.
D.h. es wird die effizienteste Kombination aus Parallelisierung der
SMART Bead Bereitstellung, Parallelisierung der Analyt
Bereitstellung und der frei wählbaren Losgröße bei der Produktion
im Batchverfahren hergestellt. Diese Möglichkeiten bestehen
sowohl bei "Affymetrix" aufgrund der flächigen
Beschichtungsverfahren, als auch bei "Flowmetrix" und dem
"Optical Sensor Array" aufgrund der zu kleinen, und damit schwer
handhabbaren, Beads nicht.

5.3 Optimale Strömungs- und Handhabungsvorgänge

Aus den guten strömungstechnischen Mischungsvorgängen
resultiert eine sehr gute Benetzung der Oberflächen der Festphase
(SMART Beads) mit den Bindungspartnern (Analyten) ebenso wie
definierte Wasch- und Spülvorgänge. Daraus resultiert ein deutlich
geringerer Einsatzstoffverbrauch, insbesondere im Vergleich mit
den strömungstechnisch sehr ungünstigen, flächigen Verfahren,
wie Sie bei "Affymetrix" verwendet werden. Dadurch wird
insgesamt eine sehr gute Reproduzierbarkeit und
Qualitätssicherung erreicht.

Aufgrund der Größe der SMART Beads ist eine Handhabung eines
einzelnen SMART Beads erzielbar, was sowohl in der Produktion,
wie auch in der Analyse den Vorteil qualitativer Mischungs- und

Trennungs- bzw. Sortiervorgängen beinhaltet. Bei sehr kleinen Partikeln, wie sie beispielsweise im "Flowmetrix"-System verwendet werden, ist nur eine quantitative Handhabung möglich. Das bedeutet, es werden Fluidmengen mit einem statistisch ermittelbaren Anteil an Partikeln einer Klasse separiert oder vermischt. Die SMART Beads ermöglichen beide Verfahren mit ihren individuellen Vorteilen.

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Systems gegenüber BioChips, welche schon, wie bei Affymetrix, in der Produktion im zweidimensional dicht gepackten ARRAYS erzeugt werden, sind:

- * Überlegene Strömungsvorgänge:
Weniger Probenmaterial, bessere Benetzung der Oberflächen der SMART Beads mit dem Probenmaterial

--> Detektion seltener Probenbestandteile mit niedriger Konzentration in der Probe möglich.

- * Einfach und sicher automatisierbare Strömungsvorgänge
(Höhere Informationsausbeute und verlässlichere Ergebnisse).

5.4 ARRAY Anordnung und Detektion der SMART Beads

Das Meßprinzip der FSC-Technik nutzt das ständig wachsende Potential der hochauflösenden Bilderfassungssensoren und insbesondere der CCD-Chips zur parallelen Detektion einer Vielzahl an SMART Beads. Diese sollen deshalb möglichst dicht in einem zweidimensionalen ARRAY am optischen CCD-Chip-Sensor zur Detektion bereitgestellt werden (Präsentation am Detektor).

Bedingt durch die Nutzung eines CCD-Chips liegt der Fokus des Systems auf einer Parallelisierung der Detektion zur Durchsatzsteigerung. Gleichzeitig wird hiedurch nicht nur die Meßgeschwindigkeit erhöht, sondern auch die Meßqualität aufgrund einer Vielzahl möglicher, paralleler Referenzmessungen.

Ziel ist es, einen möglichst dicht gepackten planaren ARRAY aus SMART Beads zu erzeugen, in dem die einzelnen SMART Beads vorzugsweise direkt nebeneinander liegen, so daß sie mittels einer CCD-Kamera gleichzeitig detektiert werden können.

5.4.1 Identifikation von Kennung oder/und Lage der SMART Beads

Identifikation der Kennung der SMART Beads:

Es kann im Rahmen der Erfindung vorgesehen sein, daß die Mikropartikel (SMART Beads) in vorbestimmter geometrischer Anordnung auf den Träger positioniert werden.

In dieser Verfahrensvariante wird dem Array durch den Verfahrensschritt der Positionierung bzw. Präsentation eine geometrische Anordnung der Mikrobeads aufgeprägt, wobei die Identifikation der Mikrobeads aufgrund ihrer Farbe nur für die Unterscheidung der Mikrobead Klassen genutzt wird, aber nicht für die Bestimmung der Lage der Mikrobeads, da diese ja durch die Gitterstruktur bereits vorgegeben ist.

Weitere, neue Verfahren, welche die SMART Beads bei der Präsentation für die anschließende Detektion bereits lagerichtig positionieren sind:

11.21.10.99
-31-

* Das Spotten der SMART Beads auf einen Träger (neuartig, da einzelne Mikropartikel gespottet werden und keine Flüssigkeit).
Denkbare Träger sind:

5

- Glas- oder Kunststoffplättchen (Chips im eigentlichen Sinn),

- Fortbewegtes Band,

- Folie auf Träger etc.

10

* Ein kapillarer, zweidimensionaler, planarer Spalt (siehe Neugebauer Kammer) auf dessen Oberflächen ein hydrophobes Gitter aufgebracht ist, welches den im Spalt verteilten SMART Beads eine genaue Lage im Spalt zuweist.

15

Die im Vergleich mit der vorstehend erwähnten Verfahrensvariante mit vorbestimmter lagerichtiger Anordnung der SMART Beads wesentlich elegantere Methode nach der Erfindung ist eine nicht definierte, freie und immer wieder neu, sprich fraktale Anordnung der SMART Beads in einem zweidimensionalen Array, dem "Fraktal SMART Chip - FSC". Hier wird die hohe Auflösung der CCD-Chips (Stand der Forschung Mai 1998: 81 Mio. Farbpixel) auch zur Lagedetektion genutzt. Mögliche "Präsentationsverfahren" sind:

20

25

* Ein kapillarer, zweidimensionaler, planarer Spalt (siehe Neugebauer Kammer),

* Parallele Kapillaren (Zwangsprinzip in zwei Dimension, Lagedetektion nur in Strömungsrichtung notwendig),

30

* Ein Ausstrich oder Stempelverfahren (analog Blutausstrich) oder

* Ein Ausrollen der SMART Beads.

Durch dieses Meßprinzip entsteht der ARRAY jedesmal neu und in undefinierter räumlicher Anordnung auf der Oberfläche des Detektors. Die Identität der einzelnen Bindungsstellen wird durch den Bead-immanenten Code bestimmt und nicht durch eine vorgegebene Lokalisation auf einem Chip.

5.5 Parallele und dynamische Detektion

Ein weiteres Potential der Nutzung von flächigen CCD-Chips zur Detektion (kein Scannvorgang) von Mikropartikeln (SMART Beads) ist die Möglichkeit, gleichzeitig das "Effizienzsteigerungspotential" einer dynamischen Detektion von bewegten SMART Beads zu nutzen. Damit werden die Potentiale von Geschwindigkeit und Parallelität in einem System vereinigt, was keines der drei beschriebenen bekannten Systeme ermöglicht.

Die dynamische (bewegte) Präsentation der SMART Beads am CCD-Chip Detektor erfolgt hierbei zum Beispiel in einer Vielzahl an parallelen Kapillaren.

5.6 Direktdetektion ohne optisch vergrößernde Elemente

Die bevorzugte direkte Detektion der Durchlichtsignale (ohne Optik zwischen dem SMART Bead-Träger und dem CCD-Bildaufnehmer) durch den CCD-Bildaufnehmer hat den Vorteil einer wesentlich niedrigeren Energiemenge, welches das Licht für eine fehlerfreie Detektion benötigt. Optische Elemente zwischen CCD-Bildwandler und SMART Bead-Träger würden Licht absorbieren und somit die Empfindlichkeit der Meßeinrichtung reduzieren. Durch die geringere Lichtintensität werden unerwünschte Streulichteefekte, ebenso wie

eine eventuelle notwendige Kühlung der verwendeten Lichtquelle, stark reduziert. Außerdem bedeutet der Wegfall einer Optik auch ein große Platzersparnis sowie eine Verringerung der Herstellkosten für die Detektionseinheit.

5

5.7 Identifikation und Nachweisverfahren "in one"

Die Verwendung moderner, hochparalleler CCD-Chip eröffnet auch die Möglichkeit, mit der Identifikation der SMART Beads nach Klasse und Lage im ARRAY auch in einer Messung die jeweilige Nachweisreaktion zu detektieren.

10

Die Signaldetektion beruht hier auf der Kolokalisation eines spektral (farbig) markierten SMART Beads und eines durch Analytbindung generierten Signales. Damit kann zusätzlich zur Signaldetektion auch der unspezifische Hintergrund minimiert werden. Somit wäre die Detektion eines Lichtintensitätsunterschiedes oder einer Farbänderung aufgrund der erfolgten Reaktion auf der Oberfläche eines SMART Beads möglich. Natürlich muß eine eindeutige Unterscheidbarkeit trotzdem erhalten bleiben. So könnten sich die SMART Beads ohne Reaktion auf ihrer Oberfläche jeweils um 10 von derzeit 256 Intensitätsstufen in einem Farbkanal unterscheiden und die SMART Beads, welche ihren Bindungspartner gefunden haben, liegen durch die biochemische Reaktion um 2-3 Intensitätsstufen unter- oder oberhalb.

15

20

25

5.8 Disposable Chips - Keine Verschleppungen

Alle für das erfindungsgemäße System denkbaren Verfahren zur planaren Präsentation der SMART Beads zur direkten Detektion mit einem CCD-Chip können mit Ausnahme des Mikropartikelspottings,

30

einfach als Disposable Verfahren (Trägerchip als Einwegartikel) ausgeführt werden. Diesen Vorteil weist weder "Flowmetrix" von Luminex, noch der "Optical Sensor Array" des Max Tishler Lab. der Tufts Universität auf. Lediglich die "GenChips" von Affymetrix sind als Disposable für ein bis maximal fünf Messungen ausgelegt. Hier spricht nur der aufgrund der aufwendigen Herstellung der Chips sehr hohe Preis gegen das Wegwerfen des Chips nach nur einer Messung.

5.9 Flexibilität der Anwendung und Breite der Anwendungsfelder

Die Breite der Anwendung reicht von der Suche nach einem seltenen Bestandteil einer Probe, der Suche nach der "Nadel im Heuhaufen" mit, im Extremfall, nur einer SMART Bead Klasse (eine Farbkodierung), bis zum Ultra High Throughput Screening - UHTS - mit immer nur je einem SMART Bead einer Klasse. Damit werden alle bekannten und derzeit absehbaren Anwendungen von der "klassischen" Immunologie bis zur modernen, zukunftsweisenden DNA-Analytik mit dem System ermöglicht.

Und wenn man mit dem Ergebnis einer Messung nicht zufrieden war, oder noch, durch die erste Messung aufgedeckter, spezifischer Klärungsbedarf besteht, so werden einfach noch ein paar SMART Beads zugeben und detektiert, was dem System ebenfalls einen enormen Flexibilitätsvorteil gegenüber GenChips ala Affymetrix verschafft.

6 Überblick über einige Aspekte der Erfindung

6.1 Individuelle Kodierung der SMART Beads

Als Verfahren zur Farbkodierung kommen in Frage:

- * Lichtdurchlässige Färbung des Materials (z.B. Glas oder Kunststoff) aus welchem die SMART Beads (Mikropartikel) hergestellt werden.

5 * Lichtdurchlässige Färbung der Oberfläche der SMART Beads.

- * Einbettung von Fluoreszenzfarbstoffen (bzw. Markern) in die SMART Beads.

10 * Einbettung von Absorptionsfarbstoffen in die SMART Beads.

- * Chemische Beschichtung der Partikeloberfläche mit einem Lumineszenzmarker.

15 Auch weitere Ordnungsprinzipien wie die Form oder Größe der Partikel oder elektromagnetische Eigenschaften sowie weitere Materialeigenschaften (magnetisch, nicht magnetisch) sind als Ergänzung denkbar.

20 6.2 Analytbestimmung

6.2.1 Potentielle Analyten

- * Nukleinsäuren (DNA, RNA, in Spezialfällen auch PNA)

25

- * Proteine, Polypeptide und Peptide in allen Erscheinungsformen, z.B. Hormone, Wachstumsfaktoren, Enzyme, Tumorantigene, Serumfaktoren, Antikörper

30

- * Carbohydrate in verschiedener Kombination, z.B. verschiedene Zucker in Lebensmitteln oder Agrarpflanzen, funktionelle Zucker, Polymere

* Lipide, z.B. Steroide, 'second messenger', Membranlipide, Cholesterol

* Andere organische Moleküle, z.B. 'drugs of abuse', Pharmaka, Metabolite, Aminosäuren, Transmitter, Pestizide, Insektizide, Lacke, verschieden Toxine

6.2.2 Varianten zur Bindung (immobilisierter Interaktionspartner)

Angestrebt wird die Etablierung der gleichzeitigen Bindung von verschiedenen Analyten und damit die Verwendung verschiedener Interaktionspartner-Kombinationen in der gleichen Bindungsreaktion.

* Hybrisierung von komplementären Nukleinsäuren
z.B. längere Moleküle wie cDNA, synthetische Oligonukleotide, PNA, RNA

* Antikörper-Antigen
z.B. natürliche Antikörper, rekombinante Antikörper und deren Untereinheiten, Antigene, allgemein Proteine und Polypeptide von Interesse

* Peptide und deren Bindung an Analyten
z.B. synthetische Peptide, natürliche Peptide

* Produkte der kombinatorischen Chemie
diese können direkt auf den Beads synthetisiert werden

6.2.3 Varianten zur Signalerzeugung

Zwei Prinzipien zur Signalerzeugung sollen vorrangig etabliert werden: die direkte Detektion eines vorher oder in der Reaktion markierten Analyten und die indirekte Detektion durch Konkurrenz des Analyten mit einem markierten Standard derselben Substanz. Die erste Variante ist für einige Anwendungen gut etabliert, für Diagnostik z.B. von Serumkomponenten aber eher schlecht geeignet. Die zweite Variante ist für diese Anwendungen daher vorzuziehen, ausserdem erlaubt sie prinzipiell eine einfachere Probenvorbereitung durch den Anwender.

Varianten zur direkten Detektion:

- * Markierung der Analyten mit Fluoreszenzfarbstoff
- * Markierung der Analyten mit Reporterenzym, anschliessend Reaktion (z.B. Chemo- und Biolumineszenz)
- * Markierung nur des gebundenen Analyten, z.B. bei Nukleinsäuren durch interkalierende (Fluoreszenz-) Farbstoffe, Doppelstrang bindende Proteine oder Antikörper
- * Sekundäre Detektion durch Detektion des gebundenen Analyten mit einer zweiten Komponente, z.B. bei PNA-DNA Hybriden durch DNA spezifischen Antikörper

Varianten zu markierten Standards:

- * Enzymgekoppelt (z.B. Chemo- und Biolumineszenz mit alkalischer Phosphatase, Peroxidase etc)

* (Fluoreszenz-)Farbstoff angekoppelt

* Herstellung von Proteinstandards als Fusionsprotein mit Reporterenzym (siehe oben) oder autofluoreszierendem Protein (z.B. GFP), z.B. für rekombinante Antikörper, Protein-Hormone, Wachstumsfaktoren etc.

6.3 Präsentation der Beads zur Detektion

Für die Präsentation der SMART Beads für die optische Detektion mit einem CCD-Chip sind insbesondere die folgenden Ausführungsvarianten vorgesehen:

* Zweidimensionaler (planarer) kapillarer Spalt (siehe Neugebauer Kammer):

Ggf. reichen die Kapillarkräfte zur Befüllung des Spaltes aus, ansonsten müssen die SMART Beads mit Überdruck an der Spalteintrittsseite und/oder Unterdruck an der Spaltaustrittsseite in den Spalt befördert werden. Desweiteren können die Kapillarkräfte, welche theoretisch bis zu 40 g erreichen können, auch durch ein entsprechend saugfähiges Material (Vlies) an der Spaltaustrittsseite verstärkt werden. Als Material für den Träger mit 2D Kapillare sind Glas oder Kunststoff möglich, wobei Träger mit Kapillare vor allem bei einer Spritzgußversion kostengünstig als Disposable (Einwegartikel) ausgeführt werden kann.

* Parallele Kapillaren in einem Glas- oder Kunststoffchip. Hier gelten ansonsten die identischen Rahmenbedingungen wie für den kapillaren Spalt, wobei diese Variante besonders für eine Messung von bewegten SMART Beads geeignet ist.

* Ausstrich oder Stempelverfahren basierend auf den Verfahren, welche für Blutausstriche verwendet werden.

* Spotten auf Träger (neuartig, da einzelne Mikropartikel und keine Flüssigkeit gespottet wird):

- Glas- oder Kunststoffplättchen (auch Durchlichtmessung möglich),

- Fortbewegtes Band aus geeignetem Material,

- Folie über Träger etc.

--> Das notwendige "Single Mikropartikel Handling" ist auch für die Sortiervorgänge bei der Zusammenstellung der einzelnen SMART Bead Kits einsetzbar.

6.4 Anregungs- und Detektionseinheit

Die Auslesung der Informationen aus einem SMART Bead ARRAY soll in einer kombinierten Anregungs- und Detektionseinheit erfolgen, wobei als preferiertes System eine Anordnung der Anregungslichtquelle direkt über dem SMART Bead ARRAY und des CCD-Chips direkt unter (bzw. umgekehrt) dem ARRAY angeordnet wird (Sandwichbauweise). Durch diese möglichst kompakte Bauweise werden die Lichtlaufwege und damit auch die benötigte Lichtintensität, ebenso wie Überlagerungseffekte benachbarter SMART Beads, minimiert. Auf die Verwendung einer aufwendigen, platzintensiven, lichtschluckenden und teuren Optik soll sowohl auf der Anregungs-, als auch auf der Detektionsseite vorzugsweise verzichtet werden.

Ein weitere Variante ist eine vertikale Ausrichtung des Chips, so daß auch Gravitationskräfte für die Be- und Entladung des Chips mit den SMART Beads genutzt werden können.

5 6.4.1 Anregungslichtquelle

Als Lichtquellen kommen je nach Farbkodierung der SMART Beads (Absorption oder Fluoreszenz etc.) und der gewählten Nachweismethode (Fluoreszenz oder Lumineszenz etc.) für zum Beispiel eine Analytbindung, folgende "Lampen" in Frage:

- * Hochparalleles Licht aus einer Lampe (Weißes Licht).
- * Hochparalleles Licht aus einer Blitzröhre.
- * Hochparalleles monochromatisches Licht.
- * Monochromatischer Laserlichtstrich (lokale Anregung entspricht dem Scannerprinzip und nutzt damit nicht mehr die Parallelität der CCD-Kamera).
- * Monochromatischer Laserstrahl (lokale Anregung entspricht dem Scannerprinzip und nutzt damit nicht mehr die Parallelität der CCD-Kamera).

Wie oben ausgeführt, jedoch mit einem entsprechenden optischen Gitter zwischen Anregungslichtquelle und SMART Bead-Chip.

Wie oben ausgeführt, jedoch mit einer entsprechenden Optik zwischen Anregungslichtquelle und SMART Bead-Chip.

6.4.2 CCD-Kamera Detektion

Die Detektionseinheit umfaßt einen CCD-Chip. Diese haben aktuell auf einer Fläche von ca. 25 x 37 mm etwa 2000 x 3000 Farbpixel, was 6 Mio. Farbpixeln oder 18 Mio. Einzelpixeln (RGB-Prinzip durch miniaturisierte Farbfilter vor den Pixeln) entspricht (Firma Cannon). Ordnet man auf einer solchen Fläche von 25 x 37 mm Mikropartikel (SMART Beads) mit einem Durchmesser von 60 µm zur Direktdetektion an, so erhält man min. 200.000 Mikropartikel (SMART Beads). Jeder Mikropartikel überdeckt dabei ca. 40 quadratische Farbpixel mit 9 bis 10 µm Kantenlänge. Damit erhält man 40 Farb- oder 120 schwarz-weiß Signale pro SMART Bead mit einer digitalen Lichtintensitätsabstufung von 256 diskreten Helligkeitsstufen je schw.-weiß Pixel. Somit ist auf jeden Fall eine ausreichende Menge an Daten für eine statistische Signalverifizierung vorhanden.

Die Grenze der maximal synchron detektierbaren, unterschiedlich farbkodierten SMART Beads liegt in der Möglichkeit der spezifischen Kodierbarkeit (chemisches Limit der reproduzierbaren Farberzeugung) der SMART Beads sowie in der Möglichkeit der optischen Erfassung der Farbunterschiede mit einem CCD-Chip. Teilt man die 256 Intensitätsstufen je Farbe (RGB) in 10 Stufen ein, so erhält man $25^3 = 15.625$ mögliche Farben, welche detektiert werden können. Baut man die Anzahl der Farbklassen durch weitere Farbfilter aus, so läßt sich die Zahl der detektierbaren Farben weiter erhöhen. Mit vierfach Farbfiltern (z.B. RGB und Magenta) vor dem oben beschriebenen CCD-Chip ließen sich theoretisch $25 \cdot 25^3 = 390.625$ Farben erkennen. Natürlich nur noch mit ca. 30 vierfach Farbpixeln. Aufgrund der großen Fortschritte in der CCD Technologie ist mit den aufgeführten Zahlen nur der aktuelle Stand der Technik beschrieben. Erste

Prototypen haben bereits auf der gleichen Fläche 81 Mio. Pixel.
Damit ergibt sich auch für die beschriebene Applikation der
CCD-Chip Technologie ein großes Wachstumspotential und die
parallele Detektion von 106 individuellen SMART Beads ist
technisch machbar.

Wie oben ausgeführt, jedoch mit einem entsprechenden optischen
Gitter zwischen SMART Bead-ARRAY und CCD-Kamera Chip.

Wie oben ausgeführt, jedoch mit einer entsprechenden Optik
zwischen SMART Bead-ARRAY und CCD-Kamera Chip.

6.4.3 Parallele Inspektionseinheit

Ein besonders interessanter Aspekt im Rahmen der vorliegenden
Erfindung ist die Verwendung einer "parallelen Inspektionseinheit".

Hierbei handelt es sich um eine Lichtemissions-
Detektionseinrichtung mit einer elektrisch steuerbaren
Lichtquellenmatrix, vorzugsweise LCD-Matrix, und einer der
Lichtquellenmatrix zugewandt-gegenüberliegenden
Lichtsensormatrix, nämlich dem CCD-Bildaufnehmer, wobei der
Träger mit den darauf bzw. darin befindlichen SMART-Beads
zwischen der Lichtquellenmatrix und dem CCD-Sensor anzuordnen
ist.

Eine Stärke dieser Inspektionseinheit sind die flexiblen
Möglichkeiten, welche sich aus der Kombination von (örtlich
oder/und zeitlich) gezielter Anregung und gezielter Detektion in
Verbindung mit modernen Hochleistungsrechnern für die
Ansteuerung und die Signalauswertung ergeben. Damit wird
gerade für optische Nachweis- und Detektionsverfahren eine neue

Technologieplattform geschaffen. Durch das "Durchtunen" oder "Abrastern" der einzelnen Lichtpunkte bzw. Lichtpunktzeilen im Zusammenspiel mit der CCD-Detektion und geeigneten Algorithmen zur Signalauswertung sind kleinste Veränderungen in den einzelnen Meßpunkten im "LCD-CCD-Lichtgitter" (Inspektionseinheit) möglich. Im Bereich der DNA-Analytik ist im Rahmen der Erfindung die direkte Detektion einer Hybridisierung auf einen Meßplatz denkbar. Die LCD-Einheit als zweidimensionale Lichtquellenmatrix kann sowohl als Lichtquelle für Absorptionsmessungen zur jeweiligen Ortsbestimmung als auch zur Fluoreszenzanregung bei der Analytbestimmung (ggf. mit anderer Hintergrundbeleuchtung) herangezogen werden.

7. Anmerkungen

Gegebenenfalls selbständige Bedeutung kommt folgenden Varianten bzw. Abänderungen des Verfahrens nach der Erfindung zu:

Das Verfahren nach Anspruch 1 kann in folgender Weise abgeändert werden: Der Schritt des Aufbringens der Mikropartikel auf einen Träger gemäß Merkmal b) kann vor dem Schritt a) des Inkontaktbringens der Probe mit einer Vielzahl von Spezies von Mikropartikeln erfolgen. Bei der vorstehend genannten Variante des Verfahrens wird als Träger ein planarer Träger bzw. ein Chip, vorzugsweise mit Kapillarspalt, verwendet, wobei ein solcher flacher (ggf. hohler) Plattenträger unmittelbar mit dem CCD-Bildaufnehmer gekoppelt werden sollte, um eine unvergrößert-bildweise Detektion des Geschehens bei dem Inkontaktbringen der Mikropartikel mit der Probe durchführen zu können.

Gegebenenfalls selbständige Bedeutung kommt auch dem Aspekt der Detektion bzw. Observation der SMART-Beads mittels CCD-Bildaufnehmern bei einem sich bewegenden Ensemble von SMART-Beads zu, wobei für derartige dynamische Messungen insbesondere Träger mit Kapillaren in Frage kommen.

Die Erfindung wird anhand eines Beispiels nachstehend unter Bezugnahme auf die Figuren näher erläutert.

Fig. 1 zeigt ein Schaubild zur Erläuterung einer Ausführungsform des Verfahrens nach der Erfindung.

Fig. 2 zeigt in einer vereinfachten perspektivischen Darstellung eine Detektionseinheit aus CCD-Bildaufnehmer und Meßsubstansträger.

Fig. 3 zeigt eine Draufsicht auf den Meßsubstansträger nach Fig. 2.

Fig. 4 zeigt einen Schnitt durch den Meßsubstansträger längs der in Fig. 3 bei IV-IV angedeuteten Schnittebene.

Fig. 5 zeigt schematisch eine Inspektionseinheit aus LCD-Matrix (Flüssigkristallanzeigenmatrix), Trägerchip gemäß Fig. 2 und CCD-Matrix in einer Sandwichanordnung.

Gemäß Fig. 1 wird in einem Schritt A das Probenmaterial 1 mit den präparierten Mikropartikeln (SMART BEADS) in einer Mischvorrichtung 5 vermischt. Das hierzu eingebrachte Ensemble von Mikropartikeln 3 umfaßt eine Vielzahl unterschiedlich eingefärbter, transparenter Mikropartikel 3, wobei Mikropartikel 3 gleicher Einfärbung zu einer Spezies gehören, die die gleichen an den Mikropartikeln 3 immobilisierten

Fängermoleküle (z.B. Oligonukleotide) aufweist. Das Vorhandensein der in der Probe befindlichen Zielanalyten wird durch Verwendung analytspezifischer markierter Nachweisreagenzien in löslicher Form, mit deren Hilfe eine Bindung der Zielanalyten an die Beads erfaßt werden kann, nachgewiesen.

Während des Schrittes A können sich dann unter Hybridisierungsbedingungen die jeweils passenden Zielanalytmoleküle an die Fängermoleküle auf der Oberfläche der betreffenden Mikropartikel (SMART-BEADS) anlagern.

Gemäß Fig. 1 kann dem Vermischungsschritt A ein Amplifikationsschritt (z.B. PCR-Amplifikation etc.) folgen.

Die Meßsubstanz aus den mit der Probe 1 in Kontakt gebrachten Mikropartikeln 3 wird auf einem Meßsubstanzträger 7 in eine planare Anordnung mit willkürlicher Verteilung der Mikropartikel 3 gebracht. Der Meßsubstanzträger 7 kann im einfachsten Fall eine Glasplatte oder transparente Kunststoffplatte sein, auf die die Mikropartikel-Meßsubstanz 3 z.B. ausgestrichen, ausgerollt oder ggf. gestempelt wird.

Gemäß dem Schritt C in Fig. 1 erfolgt in einem ersten Meßdurchgang eine bildweise Absorptionsmessung des auf dem Meßsubstanzträger 7 angeordneten Ensembles aus Mikropartikeln 3, wobei als Bilderfassungssensor ein CCD-Bildaufnehmer 9 verwendet wird. Im gezeigten Beispiel befindet sich der Meßsubstanzträger 7 zwischen dem CCD-Bildaufnehmer und einer spektral breitbandig emittierenden Lichtquelle 11, die in Fig. 1 mit einem Glühlampensymbol angedeutet ist. Vorzugsweise wird bei der Absorptionsmessung gemäß Schritt C eine Durchleuchtung des Meßsubstanzträgers 7 und der darauf vorgesehenen Meßsubstanzschicht mit parallelem Licht der Lichtquelle 11 vorgenommen. Der CCD-Bildaufnehmer 9 erfaßt dabei ein Bild des

Ensembles von Mikropartikeln 3 auf dem Meßsubstansträger 7, wobei eine Datenverarbeitungs- und -steuereinrichtung 13 die Bilddaten des CCD-Bildaufnehmers auswertet, um abzuspeichern, an welchen Bildpunktorten des CCD-Bildaufnehmers 9 welche Mikropartikel 3 bestimmter Färbung registriert wurden.

Wie in Fig. 1 angedeutet, ist die Größe der Mikropartikel 3 so gewählt, daß jedes Mikropartikel 3 mehrere Pixel (Bildpunktsensoren) 15 des CCD-Bildaufnehmers 9 in der Draufsichtprojektion überdeckt.

Nachdem im Schritt C die verschiedenen Mikropartikel-Spezien in Zuordnung zu ihrer Lage in dem aufgenommenen Bild identifiziert worden sind, erfolgt im Schritt D die Detektion der Nachweisreaktion. Im Beispielsfall erfolgt der Reaktionsnachweis durch Fluoreszenzsignale, welche von Mikropartikeln 3 ausgehen, an den sich analytspezifische Nachweisreagenzien angelagert haben. Als Fluoreszenzanregungslichtquelle dient eine UV-Lichtquelle 17, die in Fig. 1 durch ein Glühlampensymbol dargestellt ist und die paralleles Licht abgibt. Die Fluoreszenzstrahlung wird mittels dem Bildaufnehmer 9 in Zuordnung zur Lage der jeweiligen fluoreszierenden Mikropartikel 3 registriert. Das Datenverarbeitungssystem kann dann aus den Ergebnissen der Schritte C und D ermitteln, zu welcher Spezies von Mikropartikeln 3 das bzw. die Mikropartikel 3 gehören, welche ein betreffendes Fluoreszenzsignal abgegeben haben. Da so identifizierte Mikropartikel 3 bzw. die daran immobilisierten Fängermoleküle nur mit einem bestimmten Zielanalyten aus der Probe reagiert haben können, steht somit fest, daß der Zielanalyt in der Probe vorhanden war.

Fig. 2 zeigt einen Meßsubstansträger-Chip 7a in der Meßanordnung an einem CCD-Bildaufnehmer 9. Der Meßsubstansträger-Chip 7a (auch als Fraktal SMART Chip bzw. FSC bezeichnet) ist ferner in Fig. 3 in Draufsicht dargestellt. Der Chip 7a weist einen scheibenförmigen

kapillaren Spalt oder Hohlraum 19 auf, der unten und oben in der Darstellung gemäß Fig. 2 durch transparente Plattenabschnitte 21, 23 begrenzt ist. Die Spalthöhe h (vgl. Fig. 4) ist so gewählt, daß sie größer ist als der mittlere Durchmesser D der Mikropartikel 3 und kleiner ist als der doppelte Durchmesser ($2 D$) der Mikropartikel 3, so daß jeweils nur eine Schicht nebeneinander liegender Mikropartikel 3 zwischen den Plattenabschnitten 21, 23 in dem Kapillarspalt 19 Platz hat.

Der Meßsubstansträger-Chip 7a weist an seinem rechten Ende gemäß Fig. 3 und 4 eine Probeneingabe 25 für die Zuführung der Meßsubstanz (Mikropartikel 3 nach Vermischen mit der Probe) auf. Die Probeneingabe 25 steht mit dem Kapillarspalt 19 in Verbindung. Wie aus Fig. 3 zu ersehen, erstreckt sich der Kapillarspalt 19 flächenhaft über einen Detektionsbereich 27, der gemäß Fig. 2 mit dem bei 29 angedeuteten aktiven Bilderfassungsfeld des CCD-Bildaufnehmers 9 fluchtet, wenn Bildaufnehmer 9 und Trägerchip 7a zu der in Fig. 2 gezeigten Detektionseinheit zusammengefügt sind.

An der in den Fig. 2 und 3 links liegenden Austrittsseite des Kapillarspaltes 19 ist im gezeigten Beispiel ein saugfähiges Material 30 in einer Kammer des Chip 7a vorgesehen, welches die Kapillarkräfte zur Befüllung des Spaltes 19 mit Meßsubstanz durch seine Saugwirkung verstärkt. Der Meßsubstansträger 7a ist vorzugsweise aus Kunststoff in Spritzgußversion gefertigt, so daß er kostengünstig als Einwegartikel (Disposable) verwendet werden kann.

Nachzutragen ist noch, daß die Größe des Detektionsbereichs 27 des Chip 7a im wesentlichen der Größe des aktiven Bilderfassungsfeldes 29 des CCD-Sensors entspricht. Bei einer Ausführungsform hat der Detektionsbereich die Abmessungen $2,5 \text{ cm} \times 3,7 \text{ cm}$.

11.21.10.99
- 48 -

Fig. 5 zeigt schematisch die Anordnung nach Fig. 2 mit einer LCD-Matrix 35 als zweidimensionale Meß- bzw. Anregungslichtquelle, deren Lichtquellenelemente gezielt nach Intensität und Farbe des Lichtes orts- und zeitabhängig gesteuert werden können, wobei die betreffende
5 Steuereinrichtung gemeinsame Steuereinrichtung für die LCD-Matrix und die CCD-Matrix ist.

Ansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten in einer Probe umfassend die Schritte:
 - (a) Inkontaktbringen der Probe mit
 - (i) einer Vielzahl von Spezies von Mikropartikeln (3), wobei jede Spezies zum Nachweis von bestimmten Analyten geeignet ist und eine bestimmte, von anderen Spezies optisch unterscheidbare Codierung aufweist, und
 - (ii) einer Vielzahl von löslichen analytspezifischen Nachweisreagenzien, die eine signalgebende Gruppe tragen oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig sind,
 - (b) anschließendes Aufbringen der Mikropartikel (3) auf einen Träger (7; 7a) und mindestens
 - (c) Bestimmen der Analyten durch optisches Erfassen der Codierung und der Menge, des Vorhandenseins oder/und der Abwesenheit der signalgebenden Gruppen auf mindestens einer Spezies von individuellen Mikropartikeln (3) auf dem Träger (7; 7a).
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Analyten ausgewählt werden aus Zellen, subzellulären Partikeln, Nukleinsäuren, Polypeptiden, Peptiden, Glykoproteinen, Lipoproteinen, Mono-, Oligo- und Polysacchariden, Lipiden, Metaboliten, Hormonen, Mediatorsubstanzen, Neurotransmittern, Pestiziden, Insektiziden, toxischen Substanzen, pharmazeutisch wirksamen Substanzen und Kombinationen davon.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, daß man als Probe eine biologische Probe
ausgewählt aus Körperflüssigkeiten wie Serum, Blut, Plasma, Urin,
Lympe, Cerebrospinalflüssigkeit, Sperma, Speichel und dgl.,
Gewebe, Gewebeextrakten, Zellen, Zellextrakten, pflanzlichen
Proben, Umweltproben und Fäkalienproben verwendet.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 3,
dadurch gekennzeichnet, daß man Mikropartikel (3) ausgewählt
aus organischen Partikeln wie organischen Polymerlatices,
anorganischen Partikeln wie Magnetpartikeln und Glaspartikeln,
und organisch-anorganischen Verbundpartikeln verwendet.
5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß optisch transparente oder optisch
nichttransparente Mikropartikel (3) verwendet werden.
6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß man eine Anzahl von bis zu 10^6
Spezies von Mikropartikeln (3) verwendet.
7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß jede Spezies von Mikropartikeln (3)
auf ihrer Oberfläche mindestens einen immobilisierten,
unterschiedlichen, analytspezifischen Rezeptor enthält.
8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet, daß die immobilisierten,
analytspezifischen Rezeptoren ausgewählt werden aus
Nukleinsäuren wie DNA und RNA, Nukleinsäureanaloga wie
peptidischen Nukleinsäuren (PNA), Antikörpern,

Antikörperfragmenten, Antigenen, Peptiden, Haptenen und synthetischen Rezeptoren.

9. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß die Codierung der Mikropartikel (3)
durch Farbcodierung, z.B. durch Einfärbung des Materials, Färbung
der Oberfläche oder/und Einbettung von Farbstoffen erzeugt wird.
10. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung (6) auf mindestens
2 Spezies unterschiedlicher Mikropartikel erfolgt.
11. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß zur Bestimmung jedes Analyten
mindestens ein lösliches analytspezifisches Nachweisreagenz
verwendet wird, ausgewählt aus analytspezifischen Rezeptoren
und Analytanaloge.
12. Verfahren nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet, daß die löslichen analytspezifischen
Nachweisreagenzien ausgewählt werden aus Nukleinsäuren wie
DNA und RNA, Nukleinsäureanaloge wie peptidischen
Nukleinsäuren (PNA), Antikörpern, Antikörperfragmenten,
Antigenen, Peptiden, Haptenen und synthetischen Rezeptoren.
13. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß die löslichen analytspezifischen
Nachweisreagenzien direkt mit einer signalgebenden Gruppe
gekoppelt sind.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 12,

dadurch gekennzeichnet, daß die löslichen analytspezifischen Nachweisreagenzien eine mit einer signalgebenden Gruppe, vorzugsweise über eine hochaffine biologische Wechselwirkung bindefähige Gruppe tragen.

5

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß man für die Bestimmung mehrerer Analyten eine gleiche signalgebende Gruppe verwendet.

10

16. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man als signalgebende Gruppe eine Lumineszenz-, Fluoreszenz- oder Phosphoreszenzgruppe, verwendet.

15

17. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man einen planaren Träger (7) verwendet.

20

18. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Träger (7) verwendet, der eine Oberfläche ausgewählt aus Kunststoffen, Glas, Halbleitermaterialien und Metallen aufweist.

25

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man als Träger einen Chip (7a) verwendet.

30

20. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man einen optisch transparenten Träger (7; 7a) verwendet.

21. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,

11.21.10.99
- 53 -

dadurch gekennzeichnet, daß man einen Träger mit strukturierten Oberflächenbereichen verwendet.

5 22. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß das Aufbringen ein Aufstreichen,
Ausrollen, Stempeln oder Spotten einer die Mikropartikel enthalten-
den Suspension auf den Träger (7) umfaßt.

10 23. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß das Aufbringen eine Wanderung der
Mikropartikel auf dem Träger (7a) über Kapillarwirkung umfaßt.

15 24. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß das Bestimmen an einer statischen
oder einer dynamischen Anordnung der Mikropartikel auf dem
Träger erfolgt.

20 25. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß das Bestimmen mittels
hochauflösender Bilderfassungsmittel (9), z.B. einem CCD-Sensor,
erfolgt.

25 26. Verfahren nach Anspruch 25,
dadurch gekennzeichnet, daß die Größe der Mikropartikel (3) so
gewählt ist, daß ein jeweiliges Mikropartikel (3) eine Fläche von
mindestens 2, vorzugsweise von mindestens 4, besonders
bevorzugt von mindestens 9 und am meisten bevorzugt von
mindestens 16 einzelnen Pixeln überdeckt.

30 27. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß die Mikropartikel (3) einen mittleren
Durchmesser von mindestens 10 μm , vorzugsweise von

mindestens 20 μm und besonders bevorzugt von 25 μm - 80 μm aufweisen.

28. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 - 27 für die Diagnostik klinischer Parameter, z.B. für die Nukleinsäure-Diagnostik, für die biologische Grundlagenforschung, für die Forensik, für die Lebensmittelanalytik und für das Screening von medizinischen Produkten.

29. Kit, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 - 27 umfassend:

(a) eine Vielzahl von Spezies von Mikropartikeln (3) in freier Form, wobei jede Spezies zum Nachweis von bestimmten Analyten geeignet ist und eine bestimmte, von anderen Spezies optisch unterscheidbare Codierung aufweist,

(b) eine Vielzahl von löslichen analytspezifischen Nachweisreagenzien und

(c) einen Träger (7; 7a).

30. Meßeinrichtung zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten in einer Probe, insbesondere nach dem Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1 - 28, umfassend

- einen elektronischen Bilderfassungssensor (9) zur im wesentlichen unvergrößert-bildweisen Detektion des optischen Verhaltens eines Ensembles von mit der Probe in Kontakt gebrachten, auf einen Träger (7; 7a) aufgetragenen Mikropartikeln (3),

- Mittel (17) zur Anregung der Signalabgabe signalgebender Gruppen an Mikropartikeln (3) in dem Ensemble von Mikropartikeln auf dem Träger (7; 7a),
- eine Bilddaten des elektronischen Bilderfassungssensors auswertende Datenverarbeitungseinrichtung (13) zur Bereitstellung von Informationen über das Vorhandensein bestimmter Analyten in der Probe auf der Basis des detektierten optischen Verhaltens des Ensembles von Mikropartikeln (3).

10

31. Meßeinrichtung nach Anspruch 30, wobei der Bilderfassungssensor (9) ein CCD-Bildaufnehmer ist.

15

32. Meßeinrichtung nach Anspruch 30 oder 31, wobei die Mikropartikel (3) farbcodiert sind und wobei der Bilderfassungssensor (9) zur Erfassung von Farbunterschieden von Bildpunkten des jeweils aufgenommenen Bildes eines Ensembles von Mikropartikeln (3) in Zuordnung zur Lage der detektierten Bildpunkte geeignet ist, um die Lage von Mikropartikeln (3) jeweils gleicher Farbcodierung auf dem Träger (7; 7a) für die bildweise Detektion des optischen Verhaltens des Ensembles von Mikropartikeln bestimmen zu können.

20

33. Meßeinrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 32, umfassend wenigstens eine Lichtquelle (11) zur Bereitstellung von insbesondere spektral breitbandigem Licht zur parallelen Messung des optischen Absorptionsverhaltens oder Reflexionsverhaltens der einzelnen Individuen des Ensembles von Mikropartikeln (3) mittels des Bilderfassungssensors (9).

25

30

34. Meßeinrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 33, wobei die Einrichtung zur Anregung der Signalabgabe (17) wenigstens eine

Lichtquelle zur Fluoreszenzanregung wenigstens einer Spezies von Mikropartikeln (3) mit signalgebender Gruppe umfaßt und wobei der Bilderfassungssensor (9) zur Detektion des Fluoreszenzlichtes in Zuordnung zur Lage der Bildpunkte etwaig fluoreszierender Individuen bei der bildweisen Detektion des optischen Verhaltens des jeweiligen Ensembles von Mikropartikeln (3) geeignet ist.

35. Meßeinrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 34, wobei die Mikropartikel (3) hinsichtlich ihrer Form codiert sind und wobei die optische Meßeinrichtung aus Bilderfassungssensor (9) und Datenverarbeitungseinrichtung (13) dazu geeignet ist, die einzelnen Spezies von Mikropartikeln (3) aufgrund der unterschiedlichen Formkonturen im jeweils aufgenommenen Bild zu unterscheiden.
36. Meßeinrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 35, wobei der Träger ein insbesondere planares Fenster des Bilderfassungssensors ist, welches das Bildaufnahmefeld des Bilderfassungssensors nach außen hin überdeckt.
37. Meßeinrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 36, wobei der Träger (7) und der Bilderfassungssensor (9) in definierten Lagen relativ zueinander an einem gemeinsamen Haltemittel oder unmittelbar aneinander auswechselbar fixierbar sind.
38. Meßeinrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 37, wobei der Träger (7a) wenigstens einen Strömungspfad für die Mikropartikel (3) aufweist und wobei die Meßeinrichtung dazu eingerichtet ist, die bildweise Detektion des optischen Verhaltens der Mikropartikel (3) während der Bewegung des Ensembles von Mikropartikeln (3) längs des Strömungspfades durchzuführen.

11.21.10.99
- 57 -

39. Träger zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 27, insbesondere für eine Meßeinrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 38, wobei der Träger (7a) einen Hohlraum (19), insbesondere flächig ausgedehnten Kapillarspalt zur Aufnahme des Ensembles von Mikropartikeln (3) zwischen zwei mit ihren Flachseiten einander gegenüberliegenden Platten (21, 23) aufweist, von denen wenigstens eine transparent ist.
40. Träger nach Anspruch 39, wobei der Abstand zwischen den beiden Platten so gewählt ist, daß in den Hohlraum (19) jeweils nur eine Schicht von nebeneinander liegenden Mikropartikeln paßt.
41. Träger nach Anspruch 39 oder 40, wobei der Abstand zwischen den Platten (21; 23) wahlweise einstellbar ist.
42. Träger zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 27, insbesondere für eine Meßeinrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 38, wobei der Träger eine Vielzahl insbesondere parallel zueinander verlaufender Kapillarkanäle aufweist und zumindest im Bereich der Kapillarkanäle optisch transparent ist.

11.11.99
- 58 -

Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten in einer Probe angegeben, umfassend die Schritte:

- (a) Inkontaktbringen der Probe mit
 - (i) einer Vielzahl von Spezies von Mikropartikeln, wobei jede Spezies zum Nachweis von bestimmten Analyten geeignet ist und eine bestimmte, von anderen Spezies optisch unterscheidbare Codierung aufweist, und
 - (ii) einer Vielzahl von löslichen analytspezifischen Nachweisreagenzien, die eine signalgebende Gruppe tragen oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig sind,
- (b) anschließendes Aufbringen der Mikropartikel auf einen Träger und mindestens
- (c) Bestimmen der Analyten durch optisches Erfassen der Codierung und der Menge, des Vorhandenseins oder/und der Abwesenheit der signalgebenden Gruppen auf mindestens einer Spezies von individuellen Mikropartikeln auf dem Träger.

Gegenstand der Erfindung ist ferner eine Meßeinrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

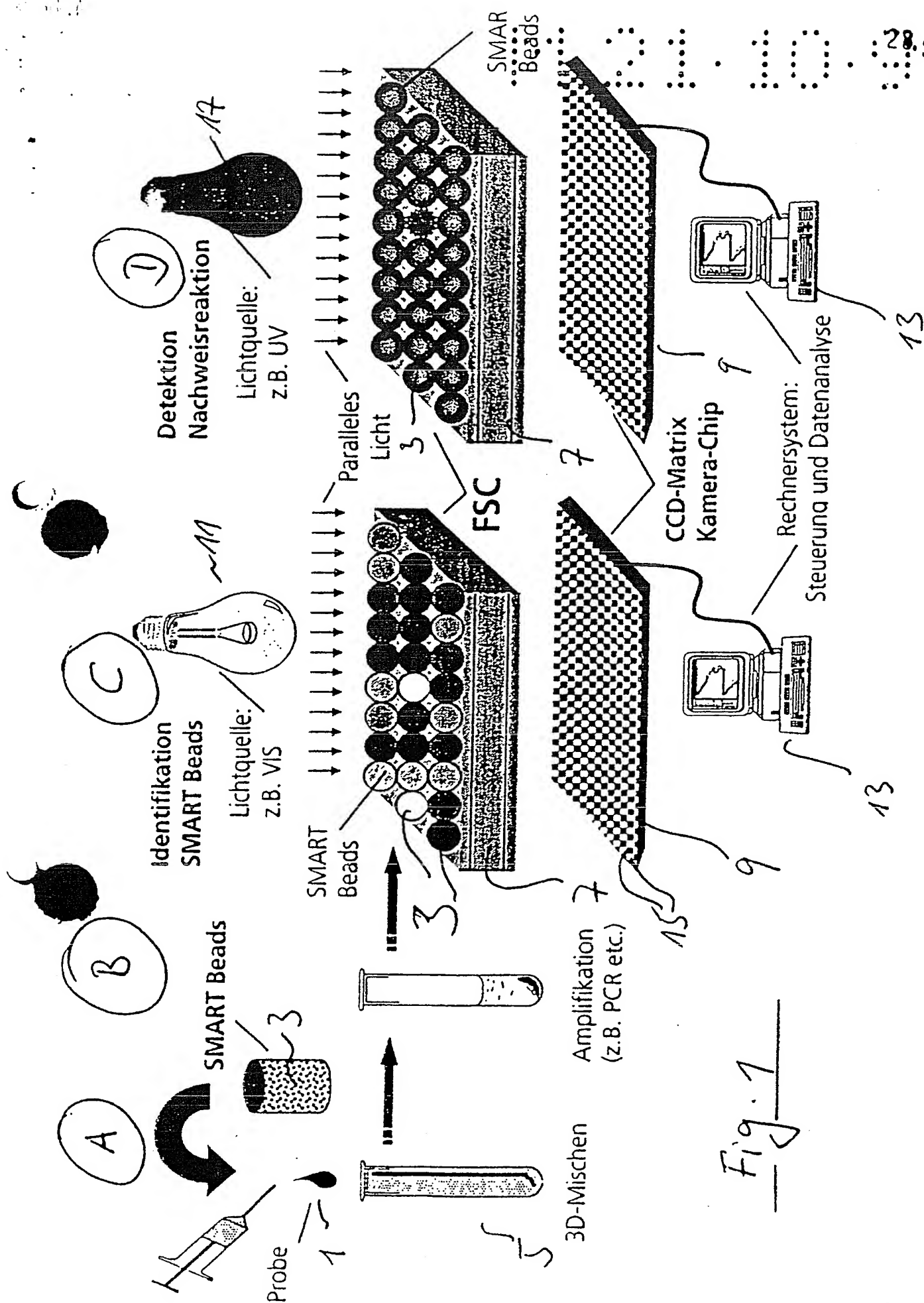
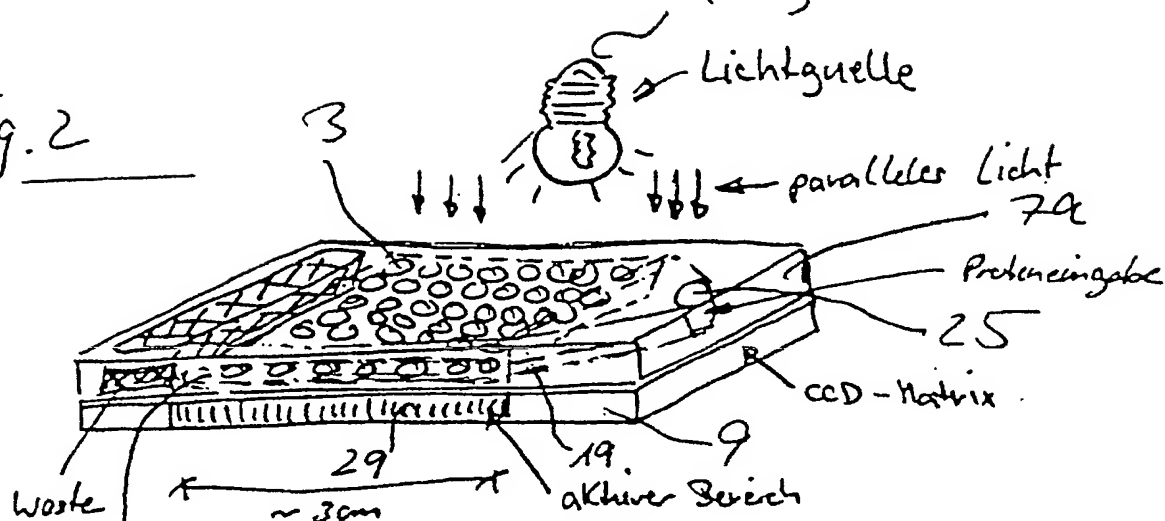


Fig. 1

M 21.10.99

(11; 17)

Fig. 2



Detektion im Durchlichtverfahren (direkte Detektion)

Fig. 3

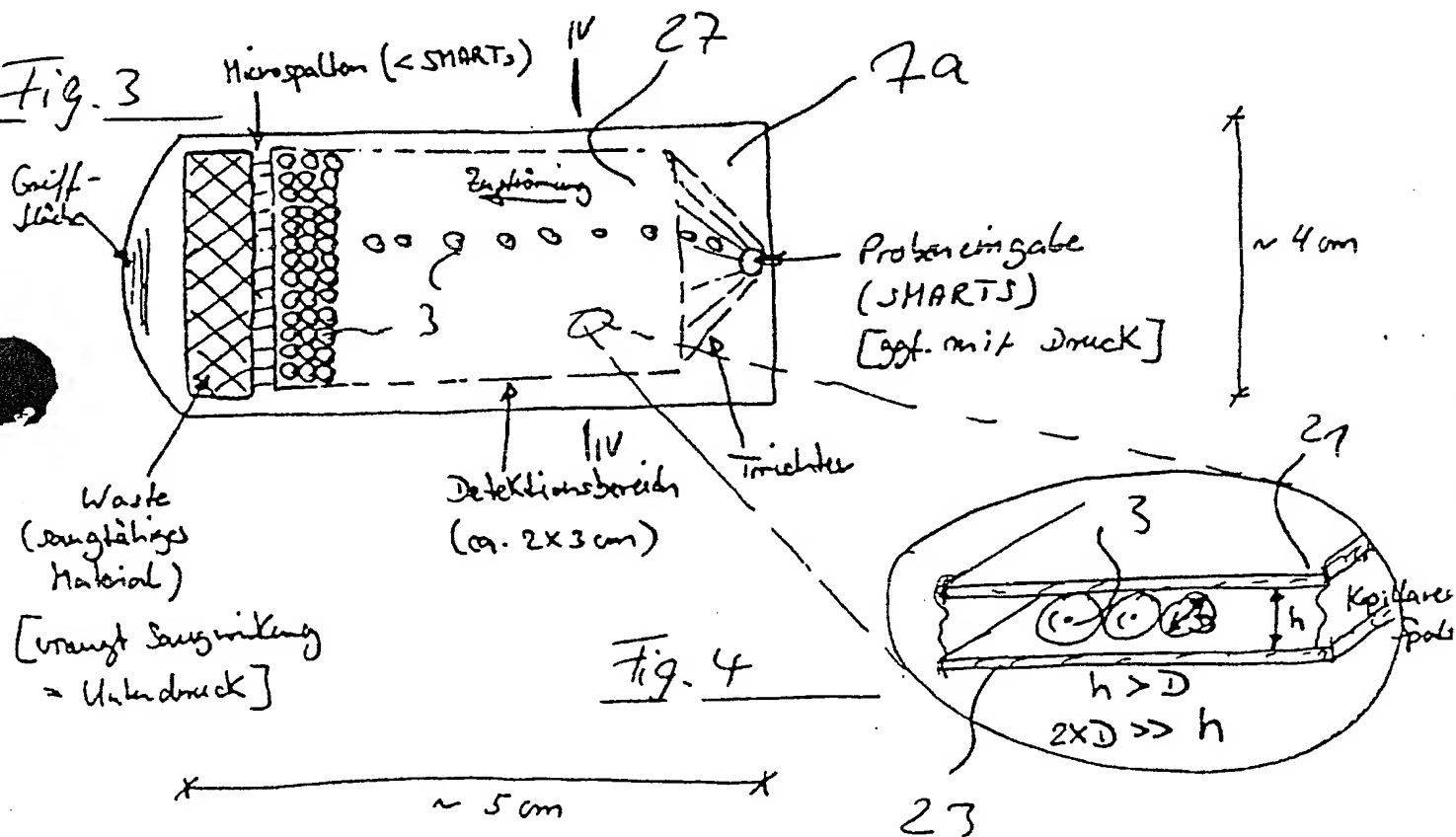
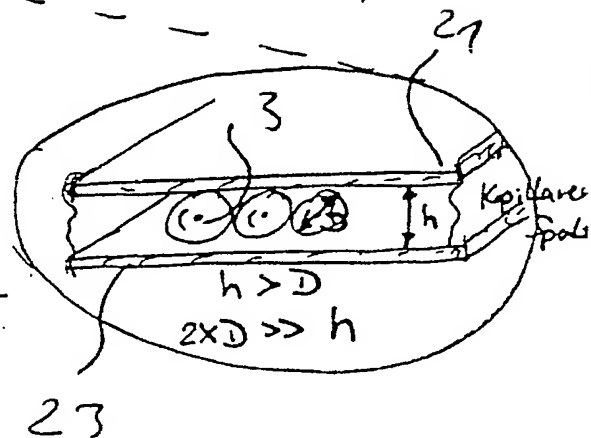


Fig. 4



M 21.10.99

Fig. 5

Ausführungsbeispiel ::

